

2013 年度 修士論文要旨

表面プラズモン励起増強蛍光イメージングによる

プラズモニクチップ上での生活習慣病マーカーIL-6 の高感度検出

関西学院大学大学院 理工学研究科

化学専攻 尾崎研究室 常安 将央

【緒言】表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance : SPR）に基づく表面プラズモン励起増強蛍光（Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence : SPF）分光法は、高感度なバイオセンシング技術として注目されている。我々は、プラズモニクチップ（波長オーダーの周期構造をもつ基板に金属薄膜を成膜したもの、図 1）を用いた SPF 法である格子結合型（Grating Coupled）SPF 法を展開し、生体分子の高感度検出に取り組んできた。本研究では、ハイスループットな多点同時計測が行える GC-SPF イメージング（GC-SPFI）装置を作製し、従来の検出法である酵素結合免疫吸着法（ELISA）と比較して迅速・高感度な検出法として確立することを目的とした。検出抗体に蛍光標識抗体を用いたサンドイッチアッセイで生活習慣病マーカータンパクの一種であるインターロイキン 6（IL-6）を検出した。また、マルチアレイプラズモニクチップを用いて、GC-SPFI による多点同時計測も行った。

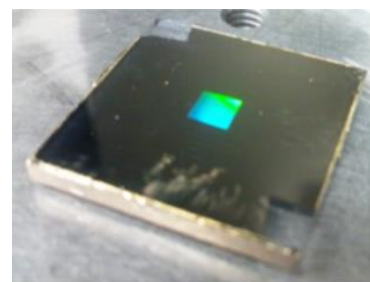


図 1 プラズモニクチップ

【実験】図2に作製した GC-SPFI 装置の概略図を示す。回転ミラーによる基板への入射角変化，基板背面からのレーザー光照射，基板の水平固定，検出器に CCD カメラを用いること，Si フォトダイオードによる反射率測定が特徴である。

光ナノインプリント法によりピッチ 430 nm の周期構造を設けた基板に高周波スパッタ法で Ag と SiO₂ 薄膜を成膜し，プラズモニクチップを作製した。その後，チップの表面化学処理を行った。モデル化合物を用いた GC-SPFI 計測では，表面を Biotin 化し，蛍光標識 Streptavidin の蛍光を検出した。IL-6 検出においては，チップ表面を N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxy-silane によりアミノ化し，PEG クロスリンカーを介して抗 IL-6 捕獲抗体を固定した。BSA によるブロッキングを行った後，各濃度（0, 2, 5, 10, 20, 50 pg/mL）に調製した抗原 IL-6（アナライト）を注入し，Alexa で蛍光標識された検出抗体を結合させ，測定を行った。また，マルチアレイチップを用いた計測では，チップの 4 つの各スポットに異なる濃度（0, 5, 10, 20 pg/mL）の抗原 IL-6 を注入し，測定を行った。

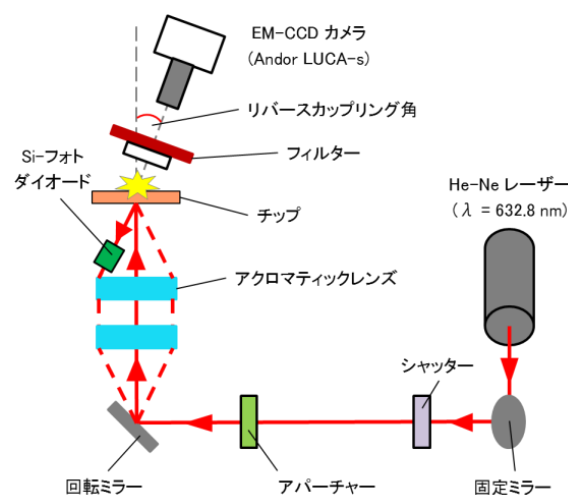


図 2 GC-SPFI 装置の概略図

【結果・考察】GC-SPFI で計測したプラズモニクチップの周期構造上での蛍光増強効果を図3に示す。IL-6 のアッセイ系で、レーザーを周期構造の端に照射したときの蛍光像である。図3より、周期構造内でのみ蛍光が増強されていることがわかる。これは、GC-SPF の蛍光増強効果に依るものである。また、モデル化合物計測では、スライドガラス（リファレンス）と比較して約 30 倍の蛍光増強度が GC-SPFI 計測で得られた。GC-SPFI 装置を用いたプラズモニクチップの有効性が示されたため、プラズモニクチップ上の IL-6 サンドイッチアッセイに対して GC-SPFI による測定を行った。

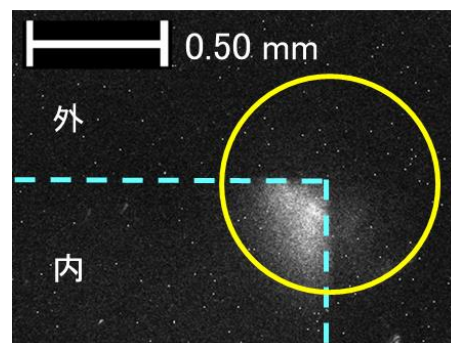


図3 IL-6 計測における周期構造端の蛍光像。水色破線は周期構造内外の境界，黄色円はレーザーの照射スポットを示す。

図4は、各 IL-6 濃度での測定において取得した蛍光像から解析した蛍光強度を IL-6 濃度に対してプロットした結果である。

濃度 0 pg/mL での蛍光強度は、非特異吸着に起因する。IL-6 濃度範囲 50 ~ 2 pg/mL において蛍光強度が定量評価された。本研究で用いた IL-6 試薬は、ELISA 法で用いたときに 4 pg/mL の検出が保証されているが、本研究結果はそれを上回り、迅速・高感度バイオマーカー検出のツールとしての GC-SPFI の可能性を示した。

さらに、IL-6 の多点同時計測では、IL-6 濃度が増加するにつれ、蛍光強度が増加した（図5）。マルチアレイプラズモニクチップにおいて IL-6 の定量評価を行うと、5 pg/mL までの IL-6 検出を達成することができた。これにより、GC-SPFI のハイスループット計測への適用性も示され、今後様々なマーカー計測への応用が期待できる。

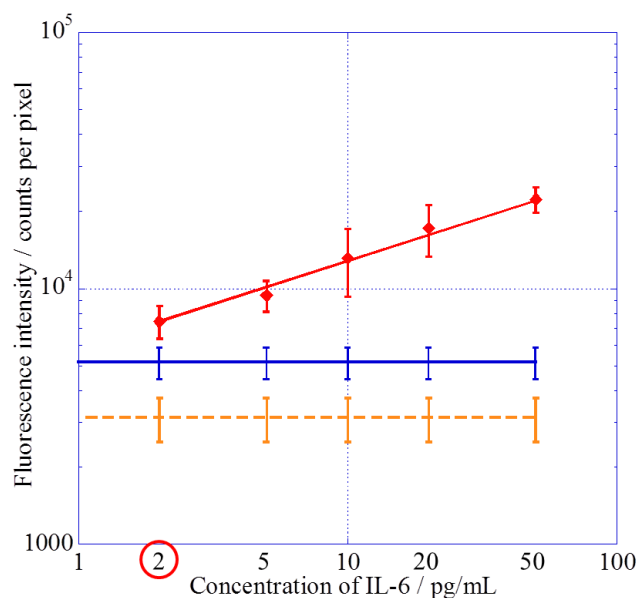


図4 IL-6 濃度に対する蛍光強度プロット。青色実線は IL-6 が 0 pg/mL の蛍光強度，橙色破線はバックグラウンド強度を示す。

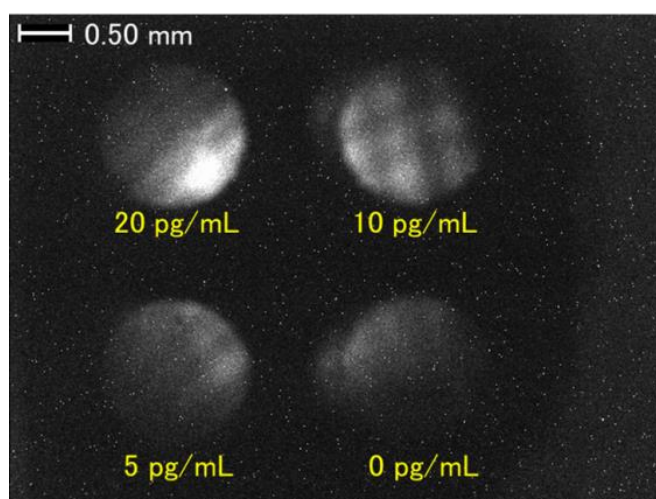


図5 IL-6 多点同時計測における蛍光像。チップの各スポットに濃度 0, 5, 10, 20 pg/mL の抗原 IL-6 を滴下した。